

Macrophage 遊走阻止反應 및 MIF 測定法

夏 潤 文

慶熙大學校 醫科大學 微生物學教室

緒 論

macrophage 遊走阻止現象은 1962年 Geoge 및 Vaughan등¹⁾이 遲延型過敏症의 生體로부터 뽑아낸 腹腔滲出細胞를 *in vitro*에서 特異抗原과 培養하면은 細胞遊走阻止가 일어난다는 것을 報告한 以來 遲延型過敏症의 *in vitro* 검사에 의한 방법으로 利用하게 된 후 David 등²⁾에 의해 詳細한 研究가 되어왔다.

macrophage의 遊走를 阻止하는 物質을 migration inhibition factor(MIF)라고 이름붙였다. 이것은 遲延型過敏症의 生體由來의 림프구상에 있다고 생각되는 特異的인 受容體와 抗原과의 상호작용에 의해 產生된다. MIF는 電氣泳動上 α_2 -globulin에 속하며 分子量은 albumin에 상당하며 이것을 正常的인 個體의 피부에 注射하면 6시간 정도 지나면 遲延型過敏症 類似의 反應을 나타낸다. 따라서 이것을 遲延型過敏症의 chemical mediator³⁾의 하나라고 생각하는 學者도 많다. 現在 macrophage 遊走阻止反應은 細胞性免疫에 의한 것으로 간주되고 있다.⁴⁻⁷⁾ 즉 여러 種類의 allergy, 蛋白抗原에 對한 遲延型過敏症, 소위 Jones-Mote型反應, 接觸性皮膚炎, 藥劑性 allergy, 移殖免疫, 自己免疫疾患 등의 研究에 利用되고 있다.

材料 와 器具

細胞 : 感作 림프구와, macrophage가 必要하다. 原法의 경우 動物(주로 guinea pig)의 腹腔에 流動 paraffin을 注入하여 4~7일 후에 腹腔浸出細胞를 使用하고 있다. 이 중에는 림프구 및 macrophage가 함유되어 있다. 모세관에 채우는 細胞는 腹腔浸出細胞를 이용할 경우를 除外하고 macrophage를 반드시 혼합되어야 한다. 보통 流動 paraffin 20~30ml을 腹腔에 注入하여 4~7일 후에 guinea pig의 腹腔細胞를 使用하는 것이 가장

편리하다.

培養液 : 0.5% lactoalbumin과 20% fetal calf serum을 첨가한 Hanks 액에 10% 증조액을 0.0125ml/ml, penicillin G를 100단위/ml, 그리고 dihydrostreptomycin을 100 μ g/ml로 加한 배양액에 탄산가스를 注入시켜 pH 6.5~6.7로 調整하여 使用한다. Hanks 액 대신에 Eagle 배양액이나 No. 199도 使用할 수 있으나 Hanks 액이 세포유주에 가장 알맞는 것으로 지적되고 있다.

器具 : 小型 chamber, chamber 밑바닥에 잘 등근형의 cover glass, 모세관(유리로 된 것, 內經 0.8mm 前後, 길이 75mm 정도가 좋다. 內經은 가급적 均일한 것을 使用해야 한다), 그와 紗-베, 피펫, 콜벤類, 分液濾斗, 그리고 silicon grease, 해부용 器具, 동물 소독액 등도 준비하여야 한다.

方法 및 實施

第1方法은 感作動物의 腹腔滲出細胞 (guinea pig의 경우 滅균 유동 paraffin 30ml를 腹腔에 注入後 4일째 Hanks 액으로 씻어 낸 것. 이 세포 중 림프구가 10~20%, 나머지는 거의 macrophage다)을 毛細管에 넣어 chamber 내에 靜置하고 여기에 抗原을 함유하고 있는 培養液를 넣어 37°C로 調節한 5% 탄산가스 培養器에 하룻밤 培養後 毛細管으로부터의 細胞의 遊走面積을 測定한다. 이 方法은 可溶性抗原에만 적용되는 方法이다.

第2方法은 感作 림프구(주로 所屬 림프절세포, 사람의 경우 臨床的으로 末稍 림프구가 利用된다)와 抗原을 混合하여 탄산가스 培養器 중에서 하룻밤 배양후 그 上清中의 MIF 活性를 測定하는 것으로 이 경우 毛細管에 넣는 macrophage는 正常動物의 것 이 좋다.

第3의 方法은 感作 림프구와 正常動物의 macrophage를 1:4의 비율로 混合한 것을 毛細管에 넣어 抗原을 함유하고 있는 培養液中에서 遊走시킨 것으로 第1과

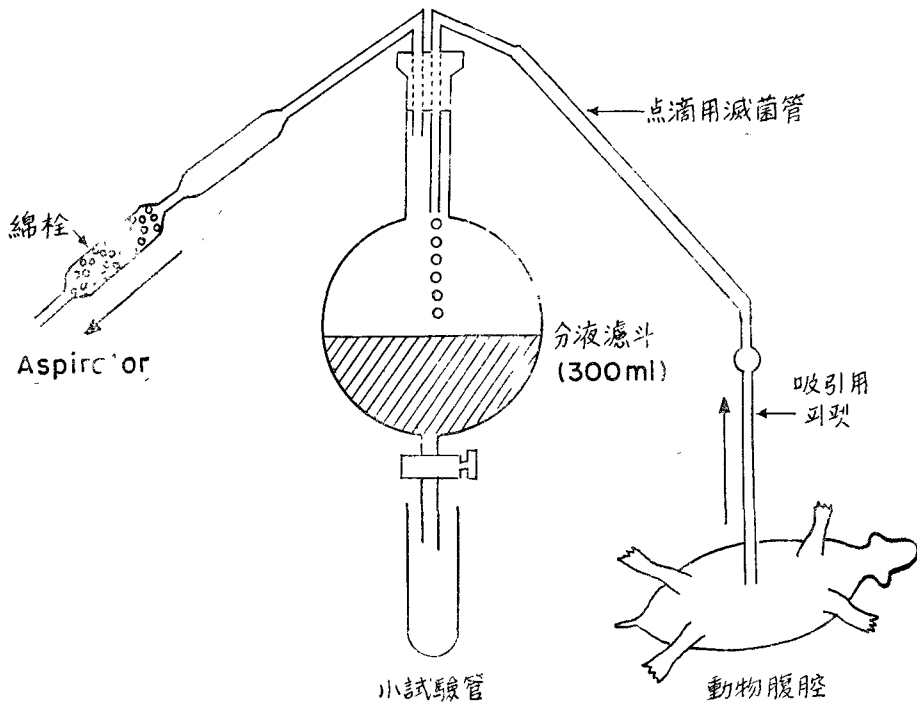
第2의 折衷法이다.

著者が 경험한 第1의 直接法에 對해서 guinea pig 例의 實施法을 간략하게 記述한다 感作 guinea pig의 腹腔에 滅菌流動 paraffin 30ml을 注入한후 接着劑로 附着시킨다. 4일후 腹部의 털을 깎고 심장 천자에 의해 失血死시킨후 hibitane alcohol로 充分히 세척후 無菌室에서 開腹한다 우선 肋수가 갈자(crucible tong) 2개로 하여 腹壁를 들어올리게 하고 穿刺器具로 작은 구멍을 낸후 그 구멍을 통하여 氷冷 Hanks액 50ml을 주사기로 注入後 갈자로 구멍을 막고 腹部를 손으로 부드럽게 문질러 Hanks액이 腹部全般에 침투하게 한후 넓게 開腹하여 수술용 근구로 내장을 누르면서 第1圖와 같은 장치로 腹腔渗出液을 吸引한다. 약 50ml씩의 Hanks액으로 3회 세척후 分液濾斗의 下部液體部分만을 (上部에는 paraffin만 남는다) 滅菌遠沈管에 옮겨 培養液으로 1회 세척후 적당량 (packed cell의 5~6倍量)의 培養液으로 再浮遊한다. 이 조작이 끝나면 毛細管에 넣어 반대측의 先端을 火焰으로 봉하고 봉한 측을 밑으로 하여 900~1,000rpm으로 7~8분간 遠沈한다 한편 P-1 사-레틀 나열하여 양손에 滅菌된 手術用 고무 장갑을 끼고 助手로부터 細胞를 채워넣은 毛細管을 받아 cutter로 細胞와 培養液과의 境界面을 切斷하여 毛細管의 봉한 側을 paraffin 테두리에 水平으로 挿入한다. 다음은 1개의 chamber에 培養液 0.5ml씩 넣고 뒤이어 抗原을 포함하

고 있는 培養液을 0.5ml씩 加하여 뚜껑을 덮고 5%탄산 가스 培養器內에서 18시간 배양한다.

判 定

成績을 判定하기 위하여 반드시 대조군을 두어야 한다. 즉 感作 림프구 混合毛細管과 未感作 guinea pig 腹腔浸出細胞(macrophage)를 채워넣은 毛細管 各各에 抗原 첨가 배양액과 抗原을 넣지 않은 배양액을 넣은 群으로 나누고 各群에 最少한 3개의 chamber를 두어 細胞遊走程度의 差가 심함으로 平均値를 취해야 한다. 하룻밤 培養하면 macrophage가 毛細管의 先端으로부터 環狀으로 遊走하고 있는 것이 보인다. 이것을 萬能投影器로 一定하게 擴大하여 遊走面積을 유산지로 trace하여 가위로 잘라 重量을 測定한다 또한 대조와 比較하여 面積比를 계산한다. 計算方式은 우선 各群의 平均遊走面積을 취한후 다음에 感作 림프구를 混合封入한 群에 抗原添加群과 抗原非添加群의 平均遊走面積의 比를 구한다 즉 (항원 첨가군의 평균 유주면적)/(항원 비첨가군의 평균유주면적)×100을 구한다. 가령 80%의 値가 얻어졌다면 같은 方法으로 未感作 guinea pig의 腹腔浸出液細胞만으로 試驗한 群에서도 (항원 첨가군 평균 유주면적)/(항원 비첨가군 평균 유주면적)×100을 구한다. 여기에서 98%의 値가 얻어진다고 하면 결국 2%



第1圖 腹腔渗出液 吸引裝置

가 抗原을 첨가해서 일어나는 非特異的 遊走阻止率이 되므로 最終判定値는 $80\% + 2\% = 82\%$ 로 한다. 이와 같은 수정치는 오로지 수년간 여러 사람의 실험의 結果 경험에서 얻어진 것으로 생각하고 있다. 최후에 양성과 음성의 경계선은 간단히 100%를 기준으로 해서는 안된다. 이것은 各實驗系에 따라서 양성치와 음성치에 어느 정도 폭이 있으므로 많은 실험의 平均値에서 얻어지지 않으면 안된다.

參 考 文 獻

1. George, M. and Vaughan, J.H.: *In vitro* cell migration as model for delayed hypersensitivity. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* (1962) 111 : 514
2. David, J.R., Al-Askari, S., Lawrence, H.S. and Thomas, L.: Delayed hypersensitivity *in vitro*. I. The specificity of inhibition of cell migration by antigen. *J. Immunol.* (1964) 93 : 264
3. Salvin, S.B., Younger, J.S. and Lederer, W. H.: Migration inhibition factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity. *Infection and Immunity* (1973) 7 : 68
4. Pick, E., Brostoff, J., Krejci, J. and Truk, J.L.: Interaction between "sensitized lymphocytes and antigen *in vitro* mitogen-induced release of skin reactive and macrophage migration inhibitory factors. *Cellular Immunology.* (1970) 1 : 92
5. James, A., Waldron, Jr., Robert, G. H. and Alan, S.R.: Antigen-induced proliferation of guinea pig lymphocytes *in vitro*. Obligatory role of macrophages in the recognition of antigen by immune T-lymphocytes. *J. Immunol.* (1973) 111 : 58
6. Remold, H.E. and David, J.R.: In mechanisms of cell-mediated immunity. Edited by R. T. McCluskey and S. Coher.: Migration inhibition factor and others mediators in cell-mediated immunity. John Wiley and Sons, New York (1974) p.25
7. Yoshida, T., Sonazaki, H. and Cohen, S.: The production of migration inhibition factor by B and T cells of the guinea pig. *J. Exp. Med.* (1973) 138 : 784